

University of Groningen

Production and utilization of peptides in *Lactococcus lactis*

Fang, Gang

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2002

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Fang, G. (2002). *Production and utilization of peptides in Lactococcus lactis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Melkzuurbacteriën worden gekenmerkt door de productie van melkzuur als eindproduct van de suikerfermentatie en worden wijd verbreid gebruikt in de voedselindustrie. Omdat melkzuurbacteriën niet in staat zijn een groot aantal aminozuren te maken hebben ze een eiwitafbrekend systeem nodig om aminozuren uit de eiwitten in hun omgeving te halen. Biochemische en genetische studies van de componenten van dit systeem hebben een goed inzicht verschaft in de rol van elk van de enzymen in de eiwitafbraak (Hoofdstuk 1). In dit proefschrift wordt de aandacht vooral gericht op het gebruik van eiwitten uit melk en de bij de afbraak van eiwitten geproduceerde peptiden door de melkzuurbacterie *L. lactis*.

Om eiwitafbraak door het eerste enzym van het eiwitafbrekend systeem, het celenvelop-verankerde proteïnase (PrtP), te kunnen bestuderen, zonder storende invloed van enzymen die de peptiden in de cel opnemen en verder afbreken, werden mutanten geconstrueerd die wel het eiwitafbrekende enzym, het proteïnase, bevatten maar niet het peptiden opnamesysteem (Oligopeptide permease, Opp). De peptiden die door het proteïnase worden vrijgemaakt uit caseïne werden gescheiden door vloeistofchromatografie en geïdentificeerd met massaspectrometrie (HPLC-MS) (Hoofdstuk 2). De meerderheid van deze peptiden variëren in grootte van 4 tot 30 aminozuren en komen vooral uit het C-terminale uiteinde van β -caseïne. Het N-terminale uiteinde van β -caseïne blijft onaangetast, terwijl andere delen van β -caseïne in geringe mate worden afgebroken. Alleen een deel van deze door PrtP- gevormde peptiden, met maximale lengten van 10 residuen, wordt opgenomen door *L. lactis*. De aminozuurvolgorde van deze peptiden werd bepaald. Alle essentiële en groei-stimulerende aminozuren, met uitzondering van histidine, blijken in deze peptiden voor te komen.

In de celmembraan van *L. lactis* komt een opnamesysteem voor dat specifiek zorgt voor het transport van di- en tripeptiden (DtpT). Dit transporteiwit van *L. lactis* is uniek onder de bacteriële transporters, aangezien het gebruik maakt van de elektrochemische gradiënt van protonen over de membraan om de opname van di- en tripeptiden te drijven. Om DtpT te kunnen karakteriseren werd het eiwit opgelost uit de membraan met het detergent *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) en gezuiverd. Dit laatste werd gerealiseerd met behulp van affiniteitschromatografie. Het gezuiverde DtpT eiwit kon vervolgens in detergent-gedestabiliseerde kunstmatige membraanblaasjes (liposomen) worden ingebouwd (gereconstitueerd). Deze reconstitutiemethode resulteerde in een model membraansysteem (proteoliposomen) met een hoge en stabiele transportactiviteit van DtpT. Bovendien kon door geschikte keuze van het detergent de inbouw van DtpT in de membraan gestuurd worden. Deze inbouw van het DtpT eiwit was met Triton X100 (TX₁₀₀) vergelijkbaar met die in intacte cellen, terwijl DtpT gedeeltelijk goed en gedeeltelijk omgekeerd georiënteerd was met DDM (Hoofdstuk 3).

De substraatspecificiteit, de transportsnelheid en de affiniteit van DtpT voor het substraat werd in deze proteoliposomen bepaald door de opname van het dipeptide Pro-[¹⁴C]Ala te bestuderen in aan- of afwezigheid van andere mogelijk concurrerende di- en tripeptiden of peptide-analoga (Hoofdstuk 4). Het DtpT eiwit bleek specifiek een hoge affiniteit te hebben voor di- en tripeptiden waarin tenminste één hydrofoob residu voorkomt. Vrije aminozuren, ω -amino-vetzuurverbindingen en peptiden met meer dan 3 aminozuurresiduen werden niet als substraat geaccepteerd. Over het algemeen is voor een hoge affiniteit nodig dat de peptiden een vrije amino- en carboxyl-terminus hebben, L-aminozuren bevatten en de aminozuren dienen door een *trans*-peptidebinding verbonden te zijn. De bacteriële

transporter DtpT blijkt meer selectief te zijn in substraatherkenning dan de eukaryote homologe di-tripeptide transporteiwitten PepT₁ en PepT₂ (Hoofdstuk 4).

De vraag welke rol het di- en tripeptide transporteiwit DtpT in het eiwitafbrekende systeem vervult is nog steeds niet goed onderzocht. Door gebruik te maken van *in vivo* en *in vitro* studies in goed gedefiniëerde mutanten van *L.lactis* en van β -caseïne afgeleide peptiden is aangetoond dat tijdens eiwitafbraak het di- en tripeptide transporteiwit DtpT een rol kan spelen in de uitscheiding van di- en tripeptiden (Hoofdstuk 5).